

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

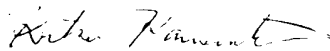
That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP98/00924 is a true and complete translation of the above identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 27th day of August, 1999

Full name of the translator: Keiko KANEMOTO

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,  
New Ohtemachi Bldg., 2-1,  
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JAPAN



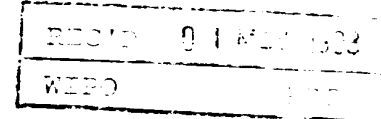
09/380372

PCT/JP98/ 0924

00.03.98

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT-



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1997年 3月 7日

出願番号

Application Number:

平成 9年特許願第070556号

出願人

Applicant(s):

中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 4月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3029476

【書類名】 特許願

【整理番号】 970257

【提出日】 平成 9年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 新規細胞株および本細胞株を用いたスクリーニング法

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社  
社内

【氏名】 北村 秀智

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代表者】 永山 治

【代理人】

【識別番号】 100027707

【弁理士】

【氏名又は名称】 湯浅 恭三

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100089705

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100076631

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100104477

【弁理士】

【氏名又は名称】 藍原 誠

【電話番号】 03-3270-6641

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013228

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9504170

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規細胞株および本細胞株を用いたスクリーニング法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株。

【請求項2】 正常成熟動物が正常成熟マウスである、請求項1に記載の細胞株。

【請求項3】 未分化間葉系細胞に由来する、請求項1または2に記載の細胞株。

【請求項4】 受託番号FERM BP-5823を有する請求項1から3の何れかに記載の細胞株。

【請求項5】 請求項1から4の何れかに記載の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質をスクリーニングするための方法。

【請求項6】 細胞の分化調節物質が、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 スクリーニングされる物質が遺伝子であることを特徴とする、請求項5または6に記載のスクリーニング方法。

【請求項8】 請求項1から4の何れか1項に記載の細胞株を含む、細胞の分化調節物質をスクリーニングするためのキット。

【請求項9】 細胞の分化調節物質が、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、請求項8に記載のキット。

【請求項10】 請求項1から4の何れかに記載の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることのできる細胞の分化調節物質。

【請求項11】 軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、請求項10に記載の細胞の分化調節物質。

【請求項12】 請求項10または11に記載の分化調節物質を含有する医

葉。

【請求項13】 変形性関節症治療薬、軟骨を含む組織の修復剤、リュウマチ治療薬、椎間板ヘルニア治療薬および抗肥満薬から成る群から選択されることを特徴とする、請求項12に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する新規な細胞株、並びに、当該細胞株を用いる未分化間葉系細胞から軟骨細胞および脂肪細胞への分化を調節する物質などを簡便に探索することを可能とする新しい *in vitro* のスクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

従来から軟骨細胞は、軟骨内骨化による骨格の形成や関節の形成による運動の円滑化など、脊椎動物が生存する上で重要な機能を果たしていることが知られている。一方で、軟骨細胞が形成している関節軟骨の損傷は、変形性関節症などの疾患においてその病態の進展を促す重要な因子であると考えられている。こうした軟骨細胞が生体内で果たす役割の重要性にもかかわらず、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化調節機構は全く解明されていない。

【0003】

一方、軟骨細胞と同様に未分化間葉系細胞に起源を有する脂肪細胞は、細胞質内に脂肪滴を蓄積することで生体内のエネルギー供給の調節に重要な働きを有することが知られている。言うまでもなく脂肪細胞における過剰な脂肪の蓄積は肥満を生じ、多くの成人病に対する危険因子として捉えられている。脂肪細胞の分化機構は、プロスタグランジン  $J_2$  を生理的リガンドとする核内受容体である PPAR- $\gamma$  や、転写因子である C/EBP- $\alpha$  等によって調節されることが報告されているが、全容が解明されているとは言えない。

ここで、未分化間葉系細胞とは、一般的に複数の分化能を有する未分化な間葉

系細胞を指すが、中でも特に多分化能を有する中胚葉由来の細胞を意味する。具体的な例としては、マウス胎児由来のC3H10T1/2 (Cell, 17:771-779, 1979) や、ラット胎仔由来のRCJ3.1 (J. Cell. Bio., 106:2139-2151, 1988) や、ラット新生仔由来のROB (Calcif. Tissue Int. 49 (3): 221-225, 1991) などが知られている。

【0004】

このような未分化間葉系細胞からの軟骨細胞および脂肪細胞への分化調節機構の研究に有用と考えられる、軟骨および脂肪細胞への分化能を有する細胞株は、胎児 (Cell, 17, 771 (1979)) や腫瘍 (J. Cell Biol. 130,1461 (1995))、新生動物 (J. Cell Biol. 106, 2139 (1988)) などに由来するものが知られているが、正常な成熟動物に由来するものは現在のところ知られていない。

こうした状況において、正常な成熟マウスなどの正常成熟動物から、軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立することができれば、成熟した個体におけるこれらの細胞の分化調節機構の研究に極めて有用な研究手段を提供できると考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的の一つは、正常な成熟動物から軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立することである。

本発明の別の目的は、上記の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするための方法確立することである。

【0006】

本発明のさらに別の目的は、上記の細胞株を含む、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするためのキットを提供することである。

本発明のさらに別の目的は、上記のような細胞株を用いるスクリーニング法に



より得られることのできる、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）、並びに上記の分化調節物質を含有する医薬を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究した結果、正常な成熟マウスの下腿骨よりクローン化細胞株を樹立することに成功した。そして、このクローン化細胞株の性状を詳細に解析した結果、この細胞株は軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有することが明らかになり、本発明を完成するに至った。

【0008】

そして、ヒトTGF- $\beta_1$ などの軟骨誘導物質に対するこの細胞株の反応性を検討した結果、この細胞株を用いてin vitroで簡便に軟骨誘導物質をスクリーニングすることができることが判明した。

同時に、1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>によってこの細胞株の石灰化が抑制されることが明らかになり、この細胞株が軟骨の石灰化を抑制する物質をin vitroで簡便にスクリーニングできることも判明した。

【0009】

また、ヒトTGF- $\beta_1$ によってCL-1細胞が形成する軟骨様組織が炎症性サイトカインであるIL-1やTNF- $\alpha$ によって破壊されることも判明し、この細胞株を用いて、こうした軟骨破壊を抑制する物質をin vitroで簡便にスクリーニングできることも明らかとなった。

さらに、1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>はこの細胞株の脂肪細胞への分化を顕著に抑制することが判明し、この細胞株を用いてin vitroで簡便に脂肪化抑制物質をスクリーニングすることができることが判明した。

【0010】

即ち、本発明の第1の側面によれば、正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株が提供される。

上記細胞株の一つの実施態様においては、正常成熟マウスに由来する細胞株が

提供される。

【0011】

上記細胞株の一つの実施態様においては、未分化間葉系細胞に由来する細胞株が提供される。

上記細胞株の一例としては、受託番号FERM BP-5823を有する細胞株が挙げられる。

【0012】

本発明の第2の側面によれば、上記の本発明の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするための方法が提供される。

上記スクリーニング法の一つの実施態様においては、スクリーニングされる物質は遺伝子である。

【0013】

本発明の第3の側面によれば、上記の本発明の細胞株を含む、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするためのキットが提供される。

【0014】

本発明の第4の側面によれば、上記した本発明の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることのできる細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）、並びに上記分化調節物質を含有する医薬が提供される。本願発明による分化調節物質を含有する医薬の具体的用途の例としては、変形性関節症治療薬、軟骨を含む組織の修復剤、リュウマチ治療薬、椎間板ヘルニア治療薬、抗肥満薬などが挙げられる。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明の細胞株の一つの特徴は、正常成熟動物に由来することである。

本明細書中において「正常成熟」という用語は、胎児由来の細胞、腫瘍細胞または新生動物由来の細胞などを排除するために用いられるものであり、広い意味に解釈されるものである。

本明細書中において「動物」という用語は、任意の動物の意味をし、例えば、哺乳類、ハ虫類、両生類、魚類、特には哺乳動物をさし、哺乳動物の具体例としては、マウス、ラット、ヒト、サル、ハムスターなどが挙げられ、好ましくはマウスである。

#### 【0016】

本発明の細胞株は、上記の動物の多様な部位、例えば、下腿骨、大腿骨、頭蓋骨、気管、耳介、鼻、椎間板、心臓などから樹立することができる。

より具体的には、生体試料を切り出し、血清および抗生物質などを適宜補充した適当な培地中で適当な期間（例えば、9～15日間）、培養する。その後、クローン性に増殖してくる細胞集落を単離し、培養を継続する。さらに細胞が増殖した後、継代を適当な回数（例えば10～12回）繰り返す。最後に、限界希釈法などのような細胞のクローニングのために当業者に既知の適当な技術を用いて細胞のクローニングを行うことにより、クローン化した細胞株を樹立することができる。

#### 【0017】

本発明の細胞株のもう一つの特徴は、軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有するということである。

細胞が軟骨細胞に分化したかどうかは、幾つかの試験により判断することができる。例えば、L-アスコルビン酸を含む培地中で培養した細胞をアルシアンブルー（pH1.0）で染色した場合に染色される結節を形成するか否かにより、軟骨細胞への分化の有無を判断することができる。ここで使用されるアルシアンブルーは銅フタロシアニンの誘導体である色素であり、カルボキシル基を有する酸性多糖（ポリアニオン）を染色できるので、組織化学において広く酸性ムコ多糖（グリコサミノグリカン）の検出およびシアル酸含有糖タンパク質の組織内分布の検出に用いられている。

#### 【0018】

あるいはまた、細胞におけるⅠⅠ型コラーゲン、X型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白の発現の有無により、軟骨細胞への分化の有無を判断することができるし、細胞の結節の内部の超微細構造を、例えば透過型電子顕微鏡などを用いて詳細に観察することなどによっても、軟骨細胞への分化の有無を判断することができる。

【0019】

一般的には、軟骨細胞への分化の有無の判断は、上記したような試験を複数組み合わせて行い、その結果を総合的に考慮して判断される。しかしながら、軟骨細胞への分化の有無を判断するために、上記以外の試験を行うことも可能であるものと理解されるべきである。例えば、トルイジンブルー染色によって結節の異染性の観察などである。

【0020】

細胞が脂肪細胞に分化したかどうか、幾つかの試験により判断することができる。例えば、オイルレッドOに染色される細胞質内脂肪滴の蓄積が認められるか否かにより脂肪細胞への分化の有無を判断することができる。あるいは、PPAR- $\gamma_2$ の発現の有無により、脂肪細胞への分化の有無を判断することができる。

【0021】

軟骨細胞への分化の有無の判断と同様に、脂肪細胞への分化の有無の判断も、上記したような試験を組み合わせて行い、その結果を総合的に考慮して判断することができる。しかしながら、脂肪細胞への分化の有無を判断するためには、上記以外の試験を行うことも可能であるものと理解されるべきである。例えば、スダンⅠⅠⅠ染色に染色される細胞質内脂肪滴の蓄積の有無や、aP2およびアジプシンの発現の有無の検討などである。

【0022】

本発明の細胞株の培養条件は、特に限定されず、細胞が死滅せずに生存または増殖できるような任意の条件下で培養することができる。例えば、培養温度は、一般的には33～39℃で、好ましくは37℃である。培養培地は、ウシ胎児血清、好ましくは非働化ウシ胎児血清（熱処理することにより、補体を不活化した

ウシ胎児血清)を3~10%(好ましくは10%)含む $\alpha$ -MEM培地を用いる。通気は、5%CO<sub>2</sub>を含む空気とし、湿度は80~120%(好ましくは100%)に保って培養を行う。

【0023】

本細胞株の保存条件も特には限定されないが、例えば、10%グリセリンあるいは10%ジメチルスルホキシドおよび10%血清を含む培地中に10<sup>2</sup>~10<sup>10</sup>、好ましくは10<sup>4</sup>~10<sup>8</sup>、さらに好ましくは10<sup>6</sup>個/mlの細胞濃度で浮遊させた状態で、-80℃あるいは液体窒素中で凍結保存することができる。好ましくは、10%グリセリンおよび10%血清を含む培地中で10<sup>6</sup>個/mlの細胞濃度で浮遊させた状態で、液体窒素中で凍結保存する。

上記のように保存された細胞株は、例えば、37℃の水浴で急速に溶解した後、10倍量の10%血清を含む培地を添加して攪拌し、遠心分離して回収した細胞を10%血清を含む培地で培養することにより再び増殖させることができる。

【0024】

本発明の第2の側面によれば、本発明の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質(例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質)をスクリーニングするための方法が提供される。

本明細書中において、「細胞の分化調節物質」とは、細胞の分化の調節に関する任意の物質を意味し、その例としてはヒト骨髄性白血病細胞株HL-60に対して、それぞれマクロファージまたは顆粒球に分化させることが知られている1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>や全トランスレチノイン酸などが挙げられる。本発明の細胞株においては、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質などが含まれる。これらの例としては、軟骨細胞への分化の促進因子としてのヒトTGF- $\beta$ <sub>1</sub>およびヒトインシュリン様増殖因子-1、脂肪細胞分化の促進物質としてのヒトインシュリン様増殖因子-1、脂肪細胞分化の抑制物質としてのヒトTGF- $\beta$ <sub>1</sub>および1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、軟骨組織の破壊を促進する物質としてのヒトインシュリン様増殖因子-1およびTNF- $\alpha$ 、軟骨細胞

の石灰化を抑制する因子としての1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>がそれぞれ挙げられる。

【0025】

本明細書中において、「軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質」とは、未分化細胞、例えば未分化間葉系細胞から、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を誘導または抑制する物質を意味する。

軟骨細胞への分化を調節する物質の例としては、軟骨誘導能を有することが知られているヒトトランスフォーミング成長因子 $\beta_1$ および軟骨細胞に対する細胞外基質産生促進作用を有することが知られているヒトインシュリン様増殖因子-Iなどが挙げられる。

脂肪細胞への分化を調節する物質の例としては、脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞に対してその脂肪化を抑制することが知られている1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>および脂肪細胞に対する脂肪合成促作用を有することが知られているヒトインシュリン様増殖因子-Iなどが挙げられる。

【0026】

本明細書中において、「軟骨組織の破壊を調節する物質」とは、軟骨組織、例えば軟骨形成能を有する細胞を一定条件下で培養した場合に形成される軟骨組織に対して、当該組織の破壊を調節する物質、特に当該組織の破壊を促進または抑制する物質を意味する。

軟骨組織の破壊を促進する物質の具体例としては、炎症性のサイトカインであるIL-1またはTNF- $\alpha$ などが挙げられる。

【0027】

本明細書中において、「軟骨細胞の石灰化を調節する物質」とは、軟骨細胞の石灰化を促進または抑制する物質を意味し、特に石灰化を抑制する物質を意味する。細胞の石灰化は、例えば、細胞中のCa含量を測定することにより評価することができる。軟骨細胞の石灰化を抑制する物質の例としては、1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>などが挙げられる。

【0028】

後記の実施例で実証されるように、本発明の細胞株は、上記に挙げた物質を用

いた場合、軟骨細胞および脂肪細胞への分化の有無、軟骨組織の破壊の程度および軟骨細胞の石灰化の程度を評価できる細胞株であると言えることから、本発明の細胞株を用いて、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質をスクリーニングすることができることは明らかである。

【0029】

また、スクリーニングされる物質の対象としては、それ自体で分化調節能力を有する生理活性物質のみならず、分化調節に何らかの形式で関与する遺伝子も含まれる。

例えば、本明細書中上記した通り、本発明の細胞株は軟骨細胞への分化に伴って、ⅠⅠ型コラーゲン、Ⅹ型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白のmRNAを発現しており、これらのmRNAは、以下の実施例に記載されているRT-PCR法や公知のTMA法（Transcription Mediated Amplification, 特表平4-500759号）などのようなmRNAの検出のために当業者に慣用される技術により検出することができる。RT-PCR法を使用する場合には、軟骨細胞への分化に関与することが推定される遺伝子の配列に特異的なPCR用プライマーを設計し、このプライマーを用いてRT-PCR法を実施することにより、軟骨細胞への分化に関与する遺伝子を単離することが可能である。

【0030】

これら遺伝子の単離には、他にも発現クローニング法などを用いることもできる。例えば、本発明の細胞から抽出したmRNAから2本鎖cDNAライブラリーを作成し、これらのcDNAを適当なベクターに組み込み、適当な動物細胞に遺伝子導入し、cDNAを発現させる。これらの細胞を軟骨細胞分化の適当な指標、例えばアルシアンブルー染色性などでスクリーニングすることにより、軟骨細胞の分化に関わる遺伝子を単離することができる。

また、軟骨細胞の分化との関連の有無にかかわらず、既知の遺伝子の塩基配列をもとにPCR法を用いて遺伝子を単離することもできる。例えば、既知の遺伝子と類似の遺伝子の塩基配列から、適当なプライマーを設計し、本発明の細胞から抽出したmRNAから作成したcDNAライブラリーを用いて適当な条件下で

PCRを行うことで既知の遺伝子と類似性の塩基配列を有する遺伝子を増幅、単離することができる。

【0031】

同様に、本発明の細胞株は脂肪細胞への分化に関与することが知られている  $PARR-\gamma_2$  の mRNA を発現しており、この mRNA は RT-PCR 法や公知の TMA 法などのような mRNA の検出のために当業者に慣用される技術により検出することができる。RT-PCR 法を使用する場合には、脂肪細胞への分化に関与することが推定される遺伝子の配列に特異的な PCR 用プライマーを設計し、このプライマーを用いて RT-PCR 法を実施することにより、脂肪細胞への分化に関与する遺伝子を単離することが可能である。

【0032】

これら遺伝子の単離には、他にも発現クローニング法などを用いることもできる。例えば、本発明の細胞から抽出した mRNA から 2 本鎖 cDNA ライブラリーを作成し、これらの cDNA を適当なベクターに組み込み、適当な動物細胞に遺伝子導入し、cDNA を発現させる。これらの細胞を脂肪細胞分化の適当な指標、例えば細胞内脂肪滴の蓄積などでスクリーニングすることにより、脂肪細胞の分化に関わる遺伝子を単離することができる。

また、脂肪細胞の分化との関連の有無にかかわらず、既知の遺伝子の塩基配列をもとに PCR 法を用いて遺伝子を単離することもできる。例えば、既知の遺伝子と類似の遺伝子の塩基配列から、適当なプライマーを設計し、本発明の細胞から抽出した mRNA から作成した cDNA ライブラリーを用いて適当な条件下で PCR を行うことで既知の遺伝子と類似性の塩基配列を有する遺伝子を増幅、単離することができる。

【0033】

さらに本発明によれば、本発明の細胞株を含む、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質をスクリーニングするためのキットが提供される。

本キット中において、本発明の細胞株は、好ましくは、容易に培養増殖可能な状態に回復できるような形態で保持されている。例えば、10%グリセリンおよ



び10%血清を含む培地中で凍結保存した状態や、培養用のフラスコで培養してある状態などである。

【0034】

本キットには通常、本発明の細胞株に加えて、スクリーニングの目的とされる物質の作用によって生じるであろう当該細胞株の性質の変化を検出するための試薬、および場合によっては、細胞株の培養の際に培地に添加すべき特定の試薬などが含まれる。

【0035】

例えば、軟骨誘導物質をスクリーニングするためのキットまたは軟骨破壊抑制物質をスクリーニングするためのキットの場合には、検出試薬としてはアルシアンブルー（pH1.0）、<sup>3</sup>H標識グルコサミンあるいは<sup>35</sup>S標識硫酸などを使用することができる。

また、脂肪細胞分化調節物質をスクリーニングするためのキットの場合には、検出試薬としてはオイルレッドO、スダンIII、トリグリセリド定量的のための試薬などを使用することができる。

【0036】

さらにまた、本発明によれば、本発明の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることができる細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）が提供される。これらの物質の種類は特には限定されず、本発明のスクリーニング法においてスクリーニングされた任意の物質（遺伝子などを含む）が含まれる。

これらの物質の中には、関節や耳、鼻の軟骨の修復、再建や、関節軟骨の石灰化抑制による関節機能の維持や、関節の炎症における関節軟骨破壊の抑制、あるいは肥満の治療などの分野において有用な治療薬剤として使用できるものが含まれる。

【0037】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって例示的に説明するが、本発明は実施例によって

限定されるものではない。

#### 実施例 1 : クローン化細胞株の樹立

正常成熟マウス下腿骨由来細胞株は、5週齢のC57BL/6マウスの下腿骨近位端から樹立された。

すなわち、マウス下腿骨を無菌的に摘出後近位端を切り出し、6穴プレート（CORNING社製）中で10%非働化血清（FBS）、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを添加したαMEM培地（GIBCO社製）で9日間培養した。培地交換後さらに4日間培養した。

【0038】

その後、クローン性に増殖している細胞集落を0.05%トリプシン+0.02%EDTA（Sigma社製）に浸した濾紙片で単離し、濾紙片ごと24穴プレート（CORNING社製）で培養した。培地交換は3日ごとに行った。濾紙片の培養開始から7日目に細胞がコンフルエントに達したのを確認後、Ca-Mgを含まないPBSと0.05%トリプシン+0.02%EDTAを用いて細胞を剥離し、60mm皿（CORNING社製）に継代した。3日ごとに培地を交換し、継代後6日で4倍の希釈倍率で細胞を継代した。以後同様にして16回まで細胞を継代し、16回目の細胞を限界希釈法を用いて細胞のクローニングを行い、クローン化細胞株であるCL-1細胞を樹立した。

上記で得られたCL-1細胞は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業研究所に、1997年2月18日に受託番号FERM B P-5823の下、寄託された。

【0039】

#### 実施例 2 : CL-1細胞の特性

前記の如くして樹立されたCL-1細胞について、in vitroでの結節形成能を検索すると共に、RT-PCR法を用いてII型コラーゲン、X型コラーゲン、アグリカンコア蛋白およびPPAR-γ<sub>2</sub>のmRNA発現の有無の検討を行い、また透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の観察を行った。

CL-1細胞を50μg/mlのL-アスコルビン酸（和光純薬社製）を添加した培地で1カ月間培養した。その後、4%パラホルムアルデヒド（pH 7.4

）で固定し、0.1 N塩酸で洗浄後、1%アルシアンブルー（EM Science社製）溶液（pH 1.0）で1時間染色し、0.1 N塩酸で分別後、光学顕微鏡下で観察した。その結果、アルシアンブルー（pH 1.0）に染色される結節が形成された（図1を参照）。

## 【0040】

また、培地に10 mMの $\beta$ グリセロリン酸を添加してCL-1細胞を同様に培養した。その後、4%パラホルムアルデヒド（pH 7.4）で固定し、蒸留水で洗浄後、1%アリザリンレッドS（Merck社製）溶液で5分間染色し、水洗後、肉眼および光学顕微鏡的に観察した。その結果、結節はアリザリンレッドSに陽性を示すようになった（図2を参照）。

また、結節を形成しない部位では、オイルレッドO（プロピレングリコール中の濃度0.5%）に染色される細胞質内脂肪滴の蓄積が認められた（図1を参照）。

## 【0041】

また、CL-1細胞の結節形成の過程におけるII型コラーゲン、X型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白のmRNA発現を、RNA PCRキット（宝酒造社製）およびこれらに特異的な塩基配列を有するプライマー（図6および配列表を参照）を用いてRT-PCR法で解析した。なお、図6中のII型コラーゲンの検出用のプライマーの配列は配列番号1および2に；図6中のX型コラーゲンの検出用のプライマーの配列は配列番号3および4に；図6中のアグリカンコア蛋白の検出用のプライマーの配列は配列番号5および6にそれぞれ記載されている。RT-PCRは、CL-1から抽出した総RNAをDNase I（宝酒造社製）処理後、キットの説明書に従って試薬を添加し、逆転写反応を行い、それに引き続いてPCRを行った。PCRは、94℃での1分間の処理を1回行い、94℃で1分間、57℃で2分間そして72℃で3分間のサイクルを40回行い、最後に72℃で7分間の処理を1回行い、4℃に冷却する条件で行った。

その結果、上記全てのmRNAについてその発現が認められた（図3から図5を参照）。

一方、PPAR- $\gamma_2$ のmRNAの発現も同様にプライマー（図6および配列

表を参照)を用いてRT-PCR法で解析した。図6中のPPAR- $\gamma_2$ の検出用のプライマーの配列は配列番号7および8に記載されている。その結果、PPAR- $\gamma_2$ の発現も認められた(図7を参照)。

【0042】

さらに、CL-1細胞の結節を透過型電子顕微鏡を用いて結節内部の超微細構造を観察したところ、軟骨細胞に類似した細胞形態と細胞間基質の構造が認められた(図8を参照)。

これらの結果から、CL-1細胞は軟骨および脂肪細胞への分化能を有する間葉系細胞であることが明らかとなった。

【0043】

さらに、CL-1細胞を $\beta$ グリセロリン酸存在下で1カ月間培養すると、CL-1細胞によって形成された結節がアリザリンレッドSに陽性であることにより、CL-1細胞より生じた軟骨様細胞は、軟骨の最終分化段階である石灰化軟骨にまで分化できることも判明した。

【0044】

実施例3：CL-1細胞を用いたin vitroでの軟骨誘導能の評価

CL-1細胞をin vitroの軟骨誘導物質のスクリーニング系として利用できるかどうかを検討するために、軟骨誘導能が知られているhTGF- $\beta_1$  (J.Biol.Chem. 261, 5693 (1986))に関して、CL-1細胞のアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性への作用を検討した。すなわち、CL-1細胞を2500細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で24穴プレート(CORNING社製)で培養し、コンフルエントに達した時点でヒトトランスフォーミング成長因子- $\beta_1$  (hTGF- $\beta_1$ ; AUSTRAL Biologicals社製)を0.1、1.0、10ng/mlの濃度で添加し、2ないし3日ごとに培地交換して、添加開始後3週間培養した。hTGF- $\beta_1$ の添加は、培地交換ごとに実施した。培養終了後、細胞を4%パラホルムアルデヒド(和光純薬社製)で固定し、水洗後0.1N塩酸(和光純薬社製)で3分処理後、アルシアンブルー(pH1.0)溶液(濃度：1%)で一晩染色した。染色終了後、サンプルを蒸留水で3回洗浄し、風乾した。乾燥したサンプルを300 $\mu$ lの6Mグアニジン塩酸溶液(和

光純薬社製)に3時間浸漬し、攪拌後グアニジン塩酸溶液の620nmにおける吸光度を測定した。その結果、hTGF- $\beta_1$ の用量依存的にアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性は増加した(図9を参照)。

【0045】

軟骨細胞に対する細胞外基質産生促進作用が知られている(Ann. Rev. Physiol. 47, 443 (1985))ヒトインシュリン様増殖因子-I(hIGF-I; CHEMICON INTERNATIONAL社製)についても同様の検討を行ったところ、100ng/mlでアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性の増加が認められた(図10を参照)。

また、CL-1細胞がコンフルエントに達した後にhTGF- $\beta_1$ (図11を参照)あるいはhIGF-I(図12を参照)を5ないし7日間連日添加した場合にも同様の結果が得られた。

形態学的にもhTGF- $\beta_1$ およびhIGF-Iの存在下で培養した場合、培地のみで培養した場合と比較して、アルシアンブルー(pH1.0)陽性の結節は明らかに増加していた(図13を参照)。

【0046】

また、インシュリン存在下で軟骨細胞に分化することが知られているATDC-5細胞(Cell Diff. Dev. 30, 109 (1990))についても、10 $\mu$ g/mlのインシュリンおよび0.1ないし10ng/mlのhTGF- $\beta_1$ の存在下で同様の方法でコンフルエント後7日間培養して、アルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性を検討した。その結果、hTGF- $\beta_1$ 処理によって、ATDC-5細胞ではアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性は用量依的に低下した(図14を参照)。

これらの結果から、CL-1細胞がin vitroで軟骨形成を評価できる有用な細胞株であることが明らかになった。

【0047】

実施例4：CL-1細胞を用いたin vitroでの軟骨破壊評価系の構築

CL-1細胞にhTGF- $\beta_1$ の存在下で培養することで形成される軟骨様結節が、炎症性のサイトカインであるIL-1やTNF- $\alpha$ によって破壊されるか

どうかを検討した。CL-1細胞を2500細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で24穴プレート(CORNING社製)で培養し、コンフルエントに達した時点でhTGF- $\beta_1$ (1.0 ng/ml)の最終濃度になるよう連日5日間培地に添加した。その後、マウスインターロイキン1 $\alpha$ (mIL-1 $\alpha$ ; R&D systems社製)およびマウス腫瘍壊死因子- $\alpha$ (mTNF- $\alpha$ ; R&D systems社製)を最終濃度0.1、1.0、10 ng/mlとなるよう培地に連日5日間添加し培養した。その後に、上記と同様の方法でCL-1細胞のアルシアンブルー(pH 1.0)に対する染色性を測定した。その結果、mIL-1 $\alpha$ は0.1 ng/ml以上(図15を参照)、mTNF- $\alpha$ は1.0 ng/ml以上(図16を参照)でアルシアンブルー(pH 1.0)に対する染色性が低下した。また、hTGF- $\beta_1$ の添加とmIL-1 $\alpha$ (図17を参照)あるいはmTNF- $\alpha$ (図18を参照)を同時に添加しても同様の成績が得られた。

【0048】

これらの結果から、CL-1細胞は炎症性サイトカインによる軟骨組織の破壊をin vitroで評価できる細胞株であることが明らかになった。また、このことから、本実験系を利用して軟骨破壊抑制物質の探索も可能であることが示された。

【0049】

#### 実施例5：CL-1細胞を用いたin vitroでの脂肪細胞分化調節物質のスクリーニング

脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞に対してその脂肪化を抑制することが知られている1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(Comp. Biochem. Physiol. 96A, (1990))のCL-1細胞の脂肪細胞への分化への影響を検討した。CL-1細胞を2500細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で4穴チャンバースライド(Nunc社製)で培養し、コンフルエントに達した時点で1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を最終濃度10<sup>-7</sup>Mになるように培地交換ごとに添加した。1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>添加開始後3週間でオイルレッドO陽性細胞内脂肪滴の蓄積を顕微鏡下で観察した。その結果、1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>はオイルレッドO陽性の細胞質内脂肪滴の蓄積を顕著に抑制していた(図19を参照)。

## 【0050】

一方、脂肪細胞に対して脂肪合成促進作用が知られているh I G F - I (Ann. Rev. Physiol. 47, 443 (1985)) についても同様の検討を行ったところ、C L - 1細胞のオイルレッドO陽性脂肪滴の蓄積は培地のみのものに比較して促進されていた(図13cを参照)。

これらのことから、C L - 1細胞は未分化な間葉系細胞から脂肪細胞への分化を抑制あるいは促進する物質の*in vitro*評価系として有用であることが明らかになった。

## 【0051】

## 実施例6：C L - 1細胞を用いた軟骨石灰化抑制物質のスクリーニング

1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>は軟骨の石灰化過程において抑制的に働くことが知られているが(Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 6522 (1990))、そのC L - 1細胞の石灰化に対する作用を検討した。

C L - 1細胞を2000細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で60mm皿(CORNING社製)で培養した。コンフルエントに達した時点で1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を最終濃度10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>および10<sup>-7</sup>Mになるように添加し、コンフルエント後4週間まで毎週サンプリングして経時的にCa含量を測定した。すなわち、細胞層をCa-Mgを含まないPBSにて3回洗浄後セルスクレイパー(Nunc社製)で剥ぎ取り回収後、60度の孵卵器中で乾燥後、オーブンで800℃で一晩燃焼し、残った灰を6N塩酸(和光純薬社製)500μlに溶解した。この溶液中のCa量をO-CPC法(Caテストワコー、和光純薬)にて定量し、皿あたりのCa沈着量を算出した。その結果、コンフルエント後2週間以降で1, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>は溶媒対照群に対して有意なCa沈着量の抑制が認められた(図20を参照)。この結果から、C L - 1細胞が軟骨の石灰化を抑制する物質を*in vitro*で評価できる細胞株であることが明らかになった。

## 【0052】

## 【発明の効果】

本発明の細胞株は、正常成熟動物に由来した、軟骨細胞および脂肪細胞に分化

---

することができる新規な細胞株である。そして、本発明の細胞株を利用することにより、細胞の分化調節物質、例えば、軟骨細胞および脂肪細胞の分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を抑制する物質、または軟骨細胞の石灰化を調節する物質などをスクリーニングすることができる。

さらにまた、本発明の細胞株を用いたスクリーニング法により得られる物質は、その特性を利用して、例えば、関節や耳、鼻の軟骨の修復・再建や、関節軟骨の石灰化抑制による関節機能の維持や、関節の炎症における関節軟骨破壊の抑制、あるいは肥満の治療などの分野において有用な治療薬剤などとして利用しうるものである。



【0053】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 19

特徴を決定した方法：E

配列

ACACAATCCA TTGCGAACC 19

【0054】

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 20

特徴を決定した方法：E

配列

AGATAGTTCC TGTCTCCGCC 20

【0055】

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 21

特徴を決定した方法：E

配列

CAGCTGGCAT AGCAACTAAG G 21

【0056】

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 20

特徴を決定した方法：E

配列

GTGGTTAGCA CTGACAAGCG 20

【0057】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 0

特徴を決定した方法：E

配列

TGTTCA GTGG AACAGCAACC 20

【0058】

配列番号：6

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 22

特徴を決定した方法：E

配列

AGATTGTTCA CTGACGTCCA CC 22

【0059】

配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 0

特徴を決定した方法：E

配列

ATGGTTGACA CAGAGATGCC 20

【0 0 6 0】

配列番号：8

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 1

特徴を決定した方法：E

配列

TGGTATTCTT GGAGCTTCAG G 21

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、CL-1細胞を4週間培養したときのアルシアンブルー（pH1.0）とオイルレッドOの2重染色標本を示す写真である。

【図2】

図2は、CL-1細胞をβグリセロリン酸で4週間培養したときのアリザリンレッドS染色標本を示す写真である。図2中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、bは10mMのβグリセロリン酸存在下でコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示す。

【図3】

図3は、I型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図3中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

【図4】

図4は、X型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図4中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

【図5】

図5は、アグリカンコア蛋白特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図5中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

【図6】

図6は、RT-PCRに用いた特異的プライマーの塩基配列を示す。

【図7】

図7は、PPAR- $\gamma$  2特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図7中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

【図8】

図8は、CL-1細胞により形成された結節内部のCL-1細胞の透過型電子顕微鏡像（拡大倍率4000倍）を示す写真である。

【図9】

図9は、hTGF- $\beta_1$ によるCL-1細胞のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図10】

図10は、hIGF-IによるCL-1細胞のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図11】

図11は、hTGF- $\beta_1$ の連日添加によるCL-1細胞のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図12】

図12は、hIGF-Iの連日添加によるCL-1細胞のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図13】

図13は、hTGF- $\beta_1$ またはhIGF-IによるCL-1細胞のアルシアンブルー陽性結節形成の変化を示す写真である。図13中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、bはhTGF- $\beta_1$ （1.0 ng/ml）でコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、cはhIGF-I（100 ng/ml）でコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示す。

【図14】

図14は、 $hTGF-\beta_1$ 連日添加によるATDC-5細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図15】

図15は、 $hTGF-\beta_1$ によって増加したCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の $mIL-1\alpha$ による変化を示すグラフである。

【図16】

図16は、 $hTGF-\beta_1$ によって増加したCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の $mTNF-\alpha$ による変化を示すグラフである。

【図17】

図17は、 $hTGF-\beta_1$ と $mIL-1\alpha$ を同時に添加したときのCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図18】

図18は、 $hTGF-\beta_1$ と $mTNF-\alpha$ を同時に添加したときのCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

【図19】

図19は、1, 25-ジヒドロキシビタミン $D_3$ によるCL-1細胞の脂肪細胞への分化抑制を示す写真である。図19中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、bは1, 25-ジヒドロキシビタミン $D_3$ （ $10^{-7}M$ ）存在下でコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示す。

【図20】

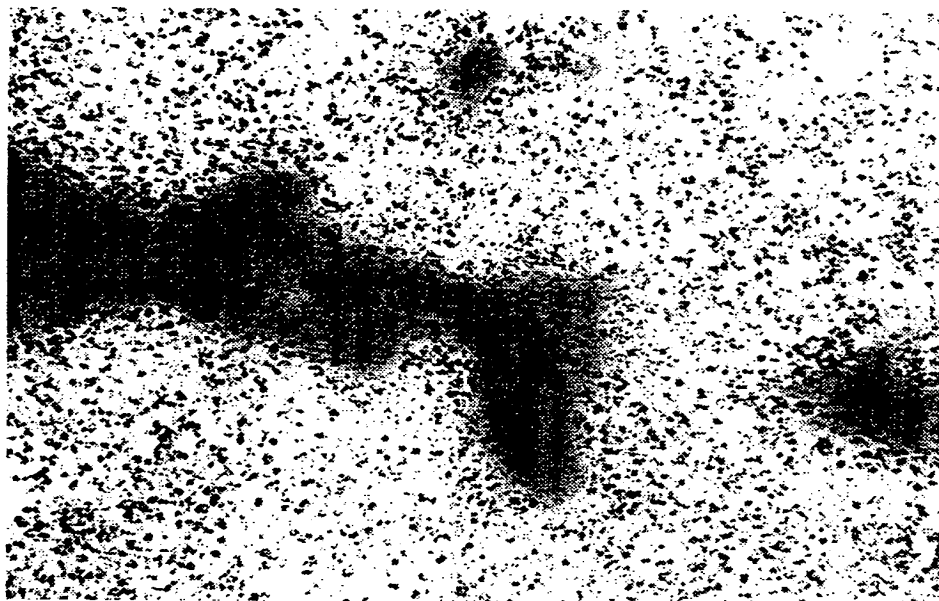
図20は、1, 25-ジヒドロキシビタミン $D_3$ によるCL-1細胞層へのCa沈着量の変化を示すグラフである。

【書類名】

図面

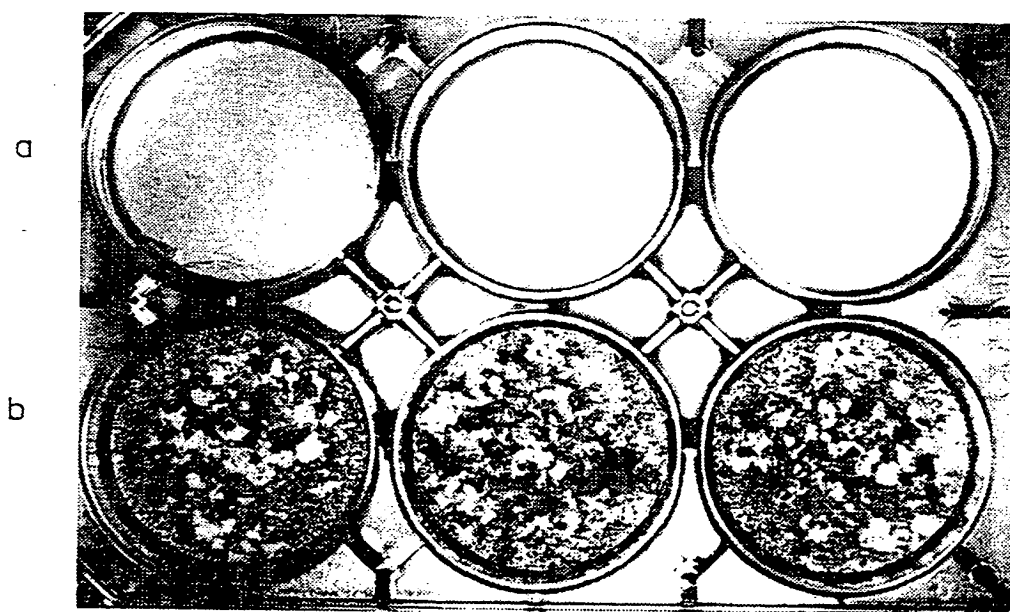
【図1】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真





【図3】

図面代用写真

a b c d

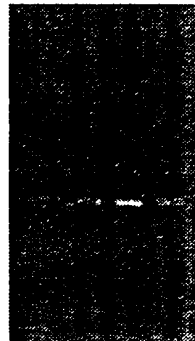


II型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCR

【図4】

図面代用写真

a b c d



X型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCR

【図5】

図面代用写真

a b c d



アグリカンコア蛋白特異的プライマーを用いたRT-PCR

【図6】

Ⅱ型コラーゲン： 5'ACACAATCCATTGCGAACC3', 5'AGATAGTTCCTGTCTCCGCC3'

X型コラーゲン： 5'CAGCTGGCATAGCAACTAAGG3', 5'GTGGTTAGCACTGACAAGCG3'

アグリカンコア蛋白：5'TGTTCAGTGGAACAGCAACC3', 5'AGATTGTTCACTGACGTCCACC3'

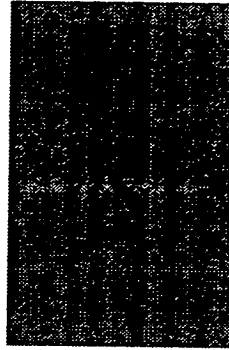
PPAR- $\gamma$ 2：5'ATGGTTGACACAGAGATGCC3', 5'TGGTATTCTTGGAGCTTCAGG3'

RT-PCRに用いた特異的プライマーの塩基配列

【図7】

図面代用写真

a b c d



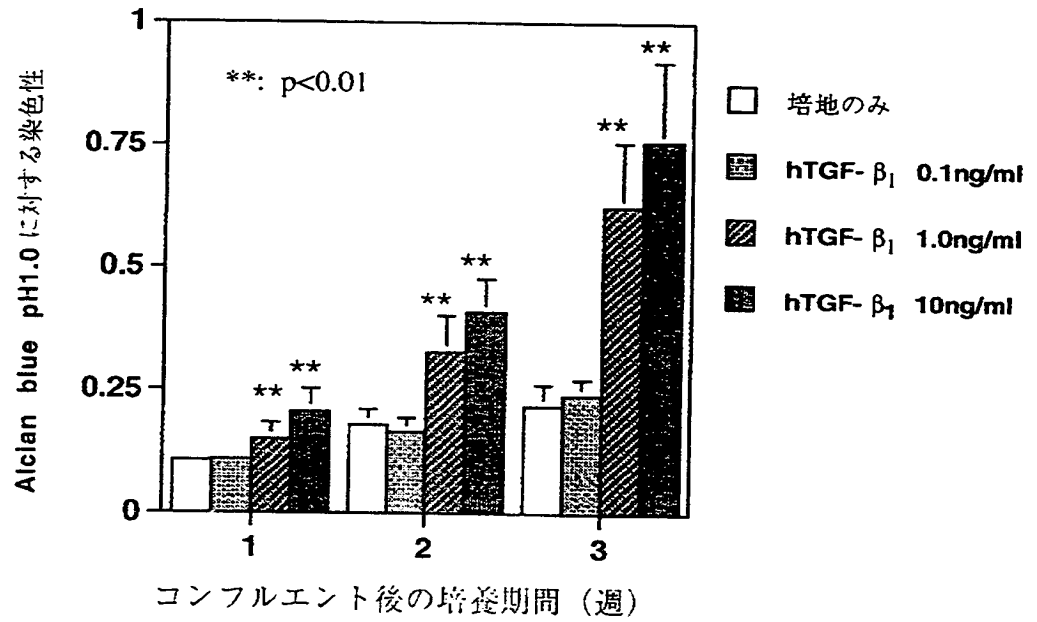
PPAR- $\gamma_2$ 特異的プライマーを用いたRT-PCR

【図8】

図面代用写真

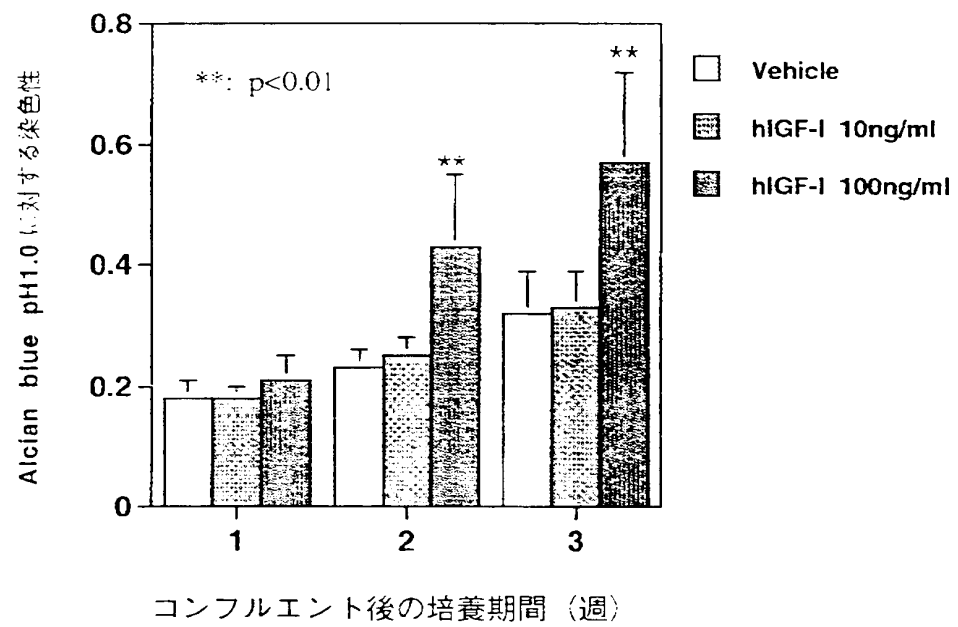


【図9】



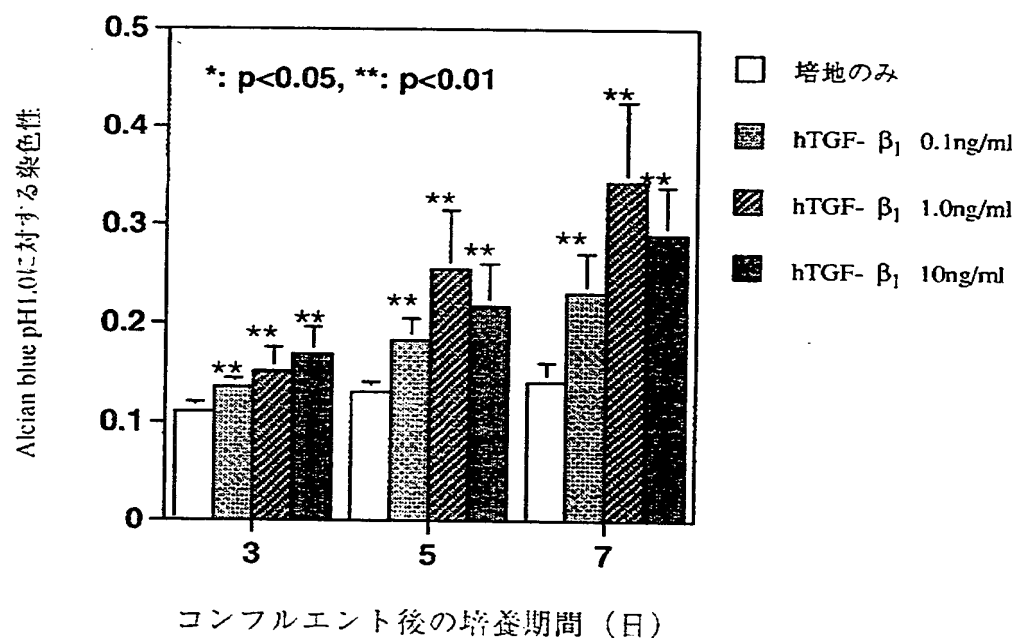
hTGF- $\beta_1$ によるCL-1細胞のAlcian blue pH1.0に対する染色性の変化

【図10】



hIGF-IによるCL-1細胞のAlcian blue pH1.0に対する染色性の変化

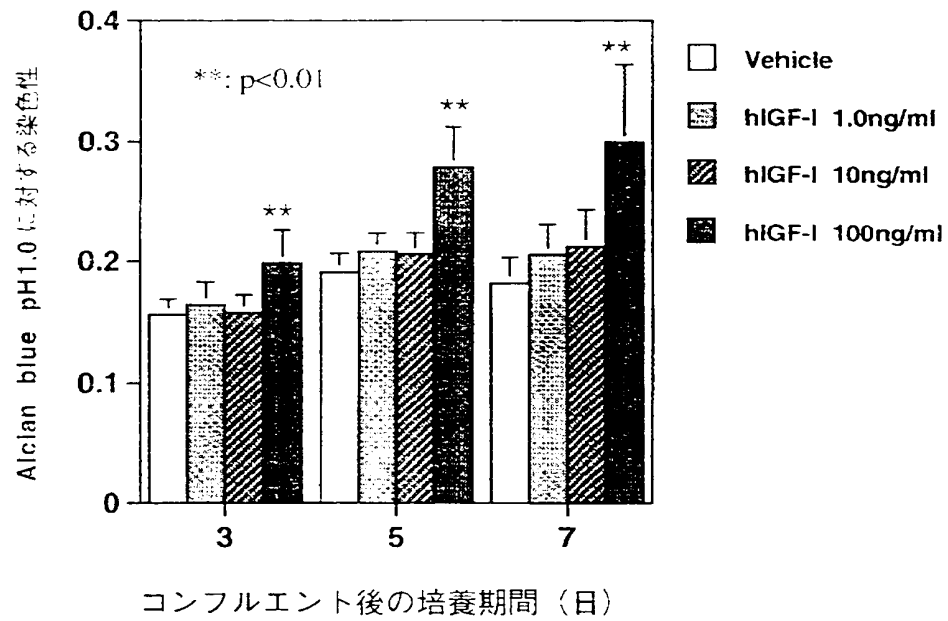
【図11】



コンフルエント後hTGF- $\beta_1$ を連日投与した場合の  
 CL-1細胞のAlcian blue pH1.0に対する染色性の変化



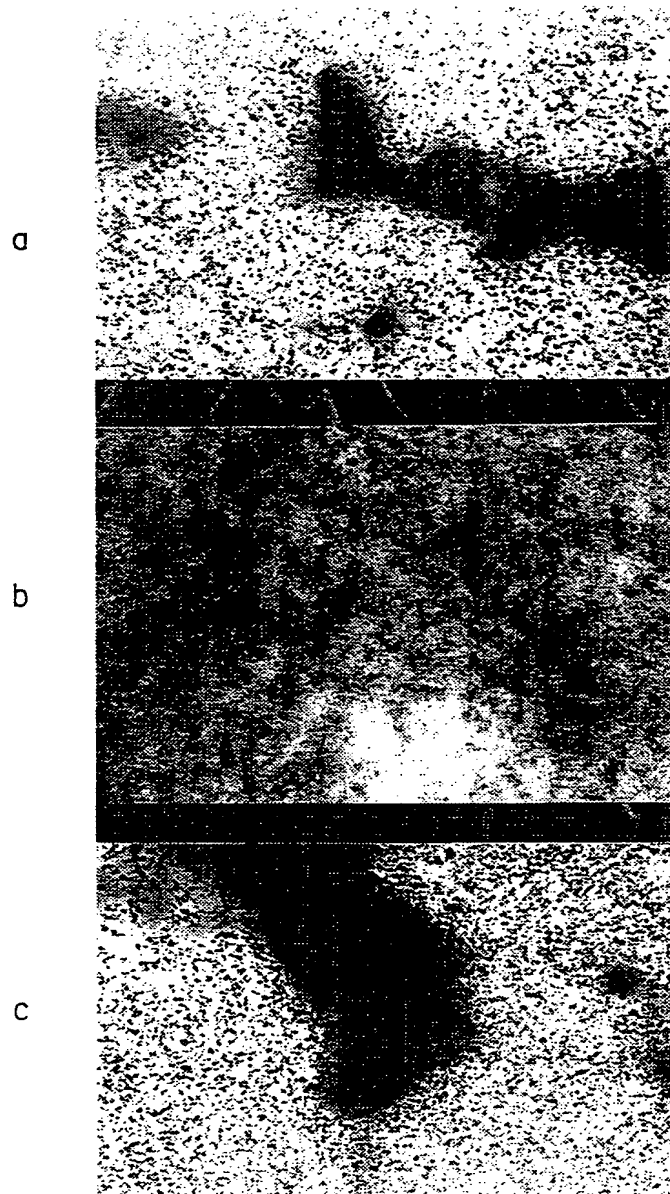
【図12】



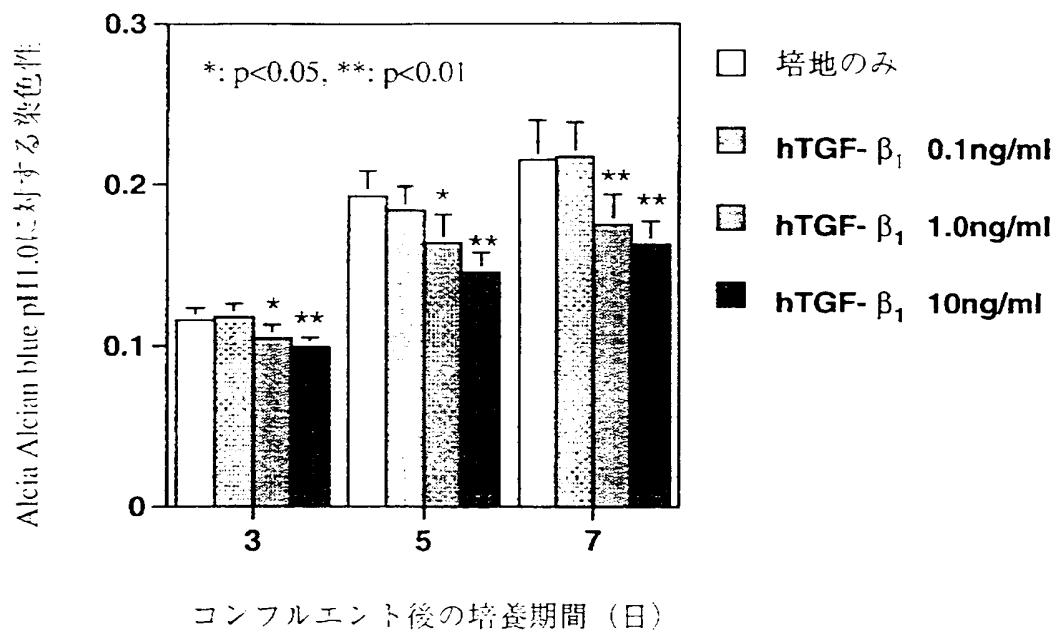
コンフルエント後hIGF-Iを連日投与した場合の  
CL-1細胞のAlcian blue pH1.0に対する染色性の変化

【図13】

図面代用写真

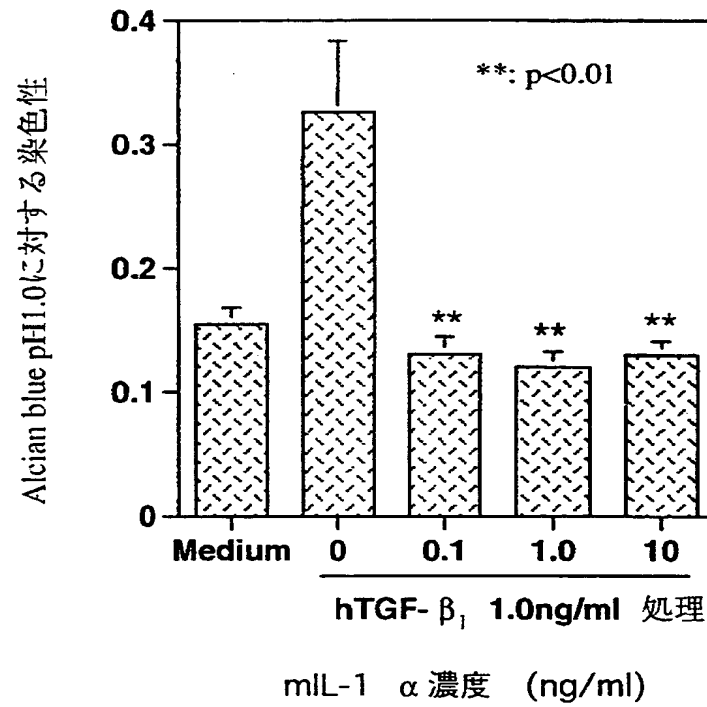


【図 1 4】



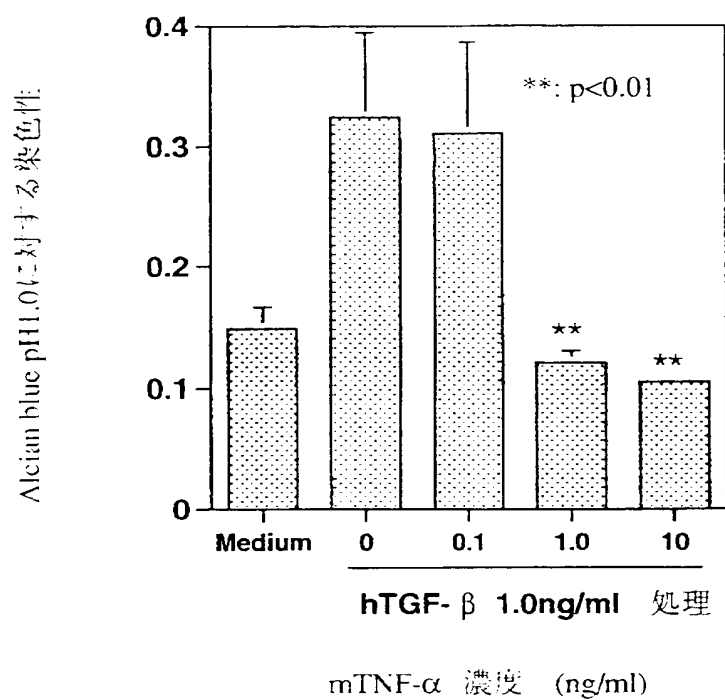
コンフルエント後hTGF- $\beta_1$ を連日投与した場合の  
ATDC-5細胞のAlcian blue pH1.0に対する染色性の変化

【図15】



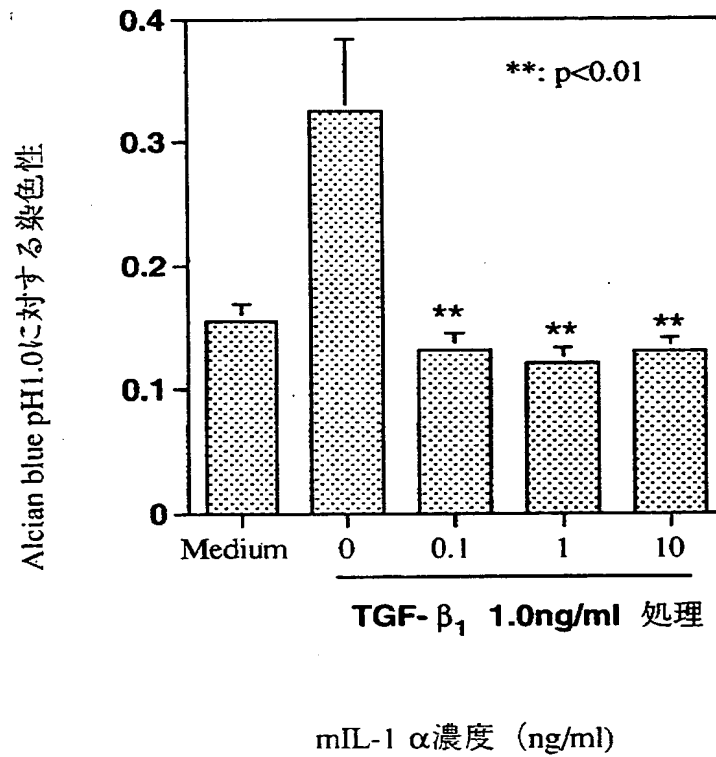
hTGF- $\beta_1$  によって増加したCL-1細胞層のAlcian blue pH1.0に対する染色性のmIL-1  $\alpha$ による変化

【図16】



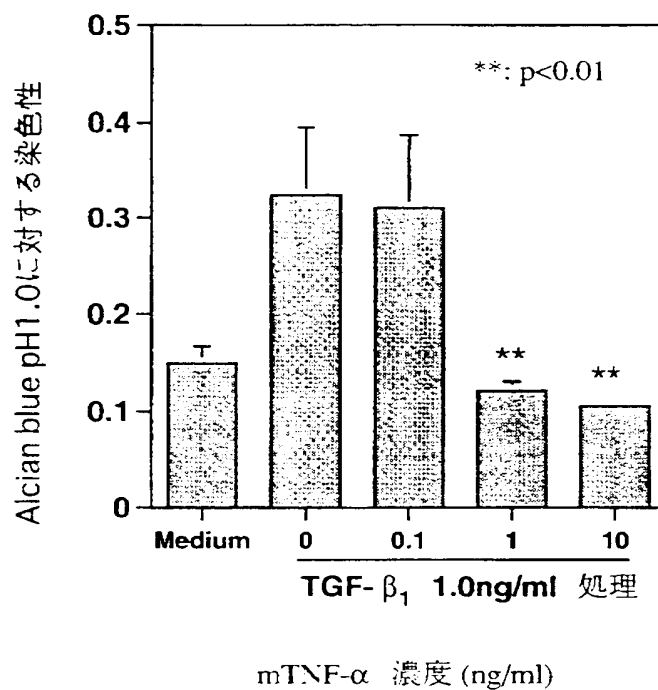
hTGF-β<sub>1</sub>によって増加したCL-1細胞層のAlcian blue pH1.0に対する染色性のmTNF-αによる変化

【図17】



hTGF- $\beta_1$  と mIL-1  $\alpha$  を同時に連日添加したときの CL-1 細胞層の Alcian blue pH1.0 に対する染色性の変化

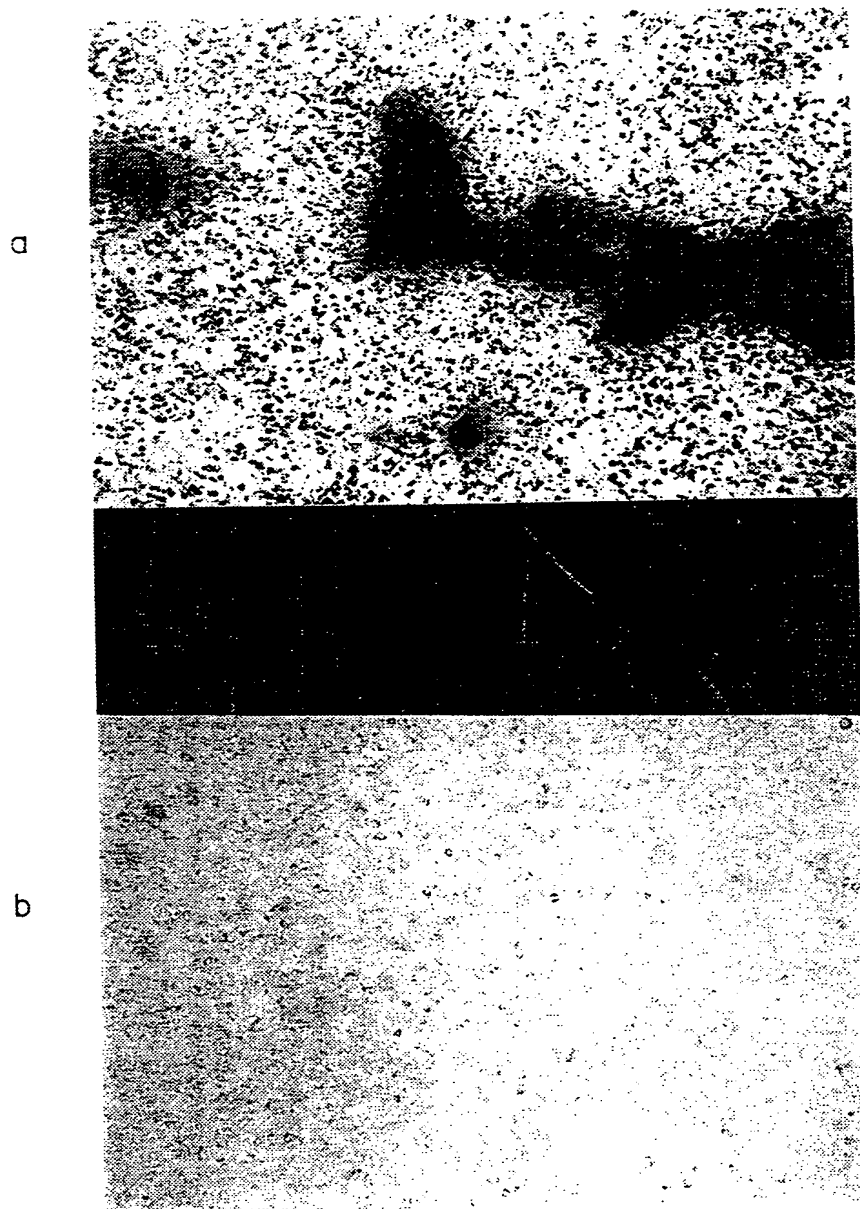
【図 18】



hTGF- $\beta_1$  と mTNF- $\alpha$  を同時に連日添加したときの CL-1 細胞層の Alcian blue pH1.0 に対する染色性の変化

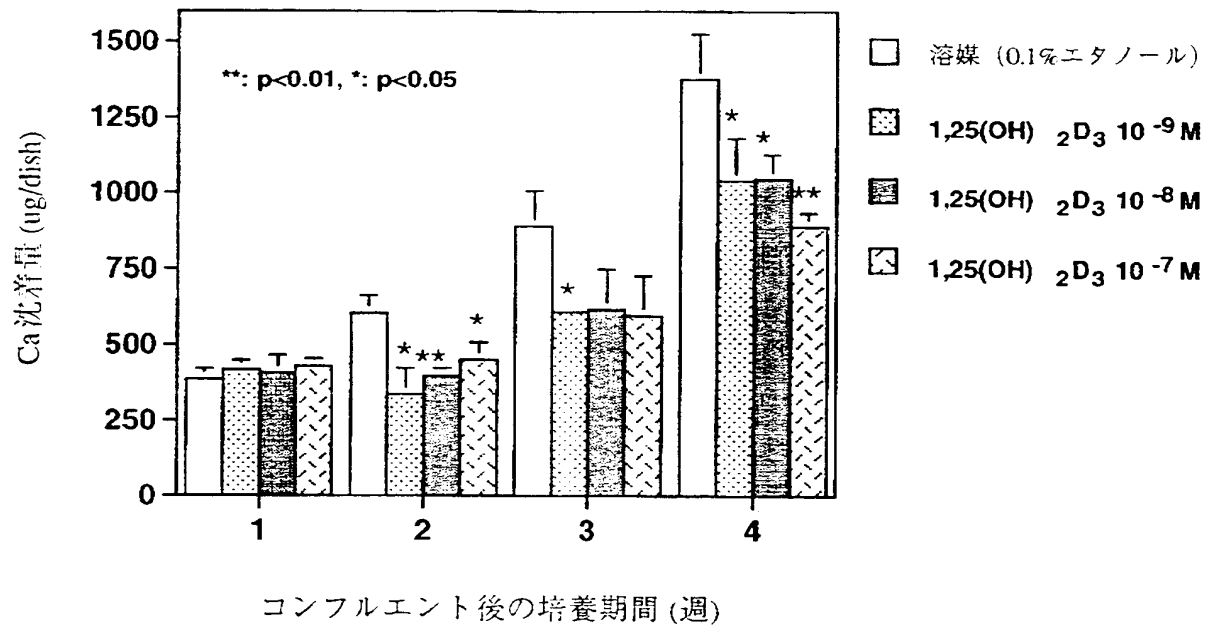
【図19】

図面代用写真





【図20】



1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によるCL-1細胞層へのCa沈着量の変化

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 正常な成熟動物から軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立し、細胞の分化調節物質のスクリーニング方法を確立すること。

【解決手段】 正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株、当該細胞株を使用する細胞の分化調節物質のスクリーニング法、当該細胞株を含むスクリーニング用キット、上記スクリーニング法に得られる細胞の分化調節物質、並びに上記分化調節物質を含有する医薬

【選択図】 なし

国際様式 INTERNATIONAL FORM



【 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタベスト条約 】

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIO-  
NAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 中外製薬株式会社  
取締役社長 永山 治  
寄託者 あて名 〒 115 東京都北区浮間5丁目5番1号 殿

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) マウス腸炎菌株CL-1	(受託番号) FERM BP- 5823
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>■ 科学的性質</div> <div>■ 分類学上の位置</div> </div>	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 2 月 18 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p style="text-align: center;">通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p style="text-align: center;">National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p style="text-align: center;">所長 大石 通  DIRECTOR GENERAL</p> <p style="text-align: center;">あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305 ) 1-3 Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, JAPAN</p> <p style="text-align: right;">平成 9 年 (1997) 2 月 18 日</p>	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003311  
【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100027707  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 湯浅 恭三

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089705  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 社本 一夫

【代理人】 申請人

【識別番号】 100071124  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【代理人】 申請人

【識別番号】 100076691  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 増井 忠武

【代理人】 申請人

【識別番号】 100075236  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【代理人】 申請人

【識別番号】 100075270  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所

【氏名又は名称】 小林 泰

【代理人】 申請人

---

【識別番号】 100104477  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビ  
ル206区 湯浅法律特許事務所  
【氏名又は名称】 藍原 誠  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社